不同地理种群尖音库蚊复组抗性动态和遗传多样性

吴中华[1,2]，燕帅国[1]，林立丰[3]，乔传令[1,*]

（1. 中国科学院动物研究所农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室,北京 100101；2. 黄冈师范学院生命科学与工程学院,湖北黄冈 438000；3. 广东省疾病预防控制中心，广州 510300）

摘要：通过生物测定、蛋白质电泳和等位酶分析等方法对 5 个不同地区的尖音库蚊复组蚊虫 *Culex pipiens* complex 的抗性水平、种群中非特异性酯酶基因表型分布和种群遗传多样性进行了研究。不同地理种群的抗性检测结果表明:5 个种群分别对敌敌畏、对硫磷、氯菊酯和溴氰菊酯的抗性较高,对残杀威、巴沙和胺菊酯的抗性较低;朝阳种群对敌敌畏抗性最高(55.7 倍),武汉种群次之;佛山种群对氯菊酯和溴氰菊酯的抗性比率高达 123 倍和 23.9 倍。酯酶电泳结果显示:5 个种群间酯酶多态性存在差异,广州和佛山两个库蚊种群酯酶表型多态性最高,有 B1,A2-B2,A8-B8,A9-B9,B10 和 A11-B11 等 6 种酯酶表型,提示高活性酯酶是主要的抗性机制。群体遗传学研究表明:每位点平均等位基因数(A)为 2.76,平均多态位点百分率(P)为 64.45%,平均预期杂合度(He)为 0.1943,种群间遗传分化系数(Fst)值为0.10,平均基因流(Nm) = 2.57,说明 5 个种群有较丰富的遗传多样性,种群内遗传多样性高于种群之间。据此推测,种群间可以通过迁徙等方式进行基因交流,使得遗传结构、抗性水平朝一致性方向变化。本研究对我国尖音库蚊复组蚊虫的综合治理有一定指导意义。

关键词：尖音库蚊复组；杀虫剂抗性；酯酶；种群结构；遗传多样性；等位酶

中图分类号：Q965.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2009)05-0522-09

Resistance dynamics and genetic diversity of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from different geographical locations in China

WU Zhong-Hua[1,2], YAN Shuai-Guo[1], LIN Li-Feng[3], QIAO Chuan-Ling[1,*] (1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects & Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. College of Life Science and Engineering, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000, China; 3. Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China)

Abstract: The resistance levels to various insecticides, the distribution of the esterase genotypes, and the genetic diversity of five different field samples of *Culex pipiens* complex were studied by bioassay, protein electrophoresis, and the analysis of resistant alleles. Using the sensitive lines S-LAB as the control, the bioassay results indicated that the five *Cx.* populations showed higher resistance against dichlorovos, parathion, deltamethrin and permethrin, but lower resistance against propoxur, bassa, and tetramethrin. Chaoyang population had the highest resistance (55.7-fold) to dichlorovos, followed by Wuhan population. Foshan population also had higher resistance levels with 123-fold to permethrin and 23.9-fold to deltamethrin. The esterase electrophoresis indicated that the five *Cx.* populations showed different phenotype polymorphisms. The esterase of the *Cx.* populations from Guangzhou and Foshan exhibited the highest phenotype polymorphism with B1, A2-B2, A8-B8, A9-B9, B10 and A11-B11, suggesting that the over-produced esterases be the main mechanisms for resistance. Population genetics results indicated that the number of average allele, average polymorphism site, average expected heterozygosity, differentiation coefficient (Fst) and average gene flow (Nm) were 2.76, 66.45%, 0.1943, 0.10 and 2.57, respectively. The results showed that the five *Cx.* populations have a wealth of genetic diversity and the genetic diversity within populations is higher than that between populations. It is so inferred that the genetic diversities and the resistance levels became more identical through gene communication among the field populations by migration

基金项目：国家自然科学基金项目(30771875)；中国科学院创新方向课题(KSCX3-IOZ-0806)

作者简介：吴中华,男,1958 年生,副教授,主要从事害虫抗药性研究，E-mail：swwzh@hgnu.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail：qiaocl@ioz.ac.cn

收稿日期 Received：2008-10-07；接受日期 Accepted：2009-04-02

or others. This study may provide a guide to integrated pest management for *Cx. pipiens* complex in China.
Key words: *Culex pipiens* complex; insecticide resistance; esterases; population structure; genetic diversity; isoenzyme

蚊虫是重要的媒介害虫,尖音库蚊复组蚊虫 *Culex pipiens* complex 是分布广、种群密度高的家栖性病媒蚊虫,是斑氏丝虫病及乙型脑炎等疾病的主要传播媒介,入室骚扰并传播多种疾病对人类的健康构成极大的危害。由于各种杀虫剂的长期大量使用,现在大部分地区的蚊虫均已产生不同程度的抗性(唐振华, 1993)。研究表明尖音库蚊复组蚊虫对有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂产生抗性与非特异性酯酶(简称酯酶)活性升高有关,由基因扩增导致酯酶的过量产生是世界各地尖音库蚊复组蚊虫产生抗性的主要原因(Mouches *et al*., 1986; Raymond *et al*., 1991; Poirié *et al*.,1992; Xu *et al*.,1994; Vaugh *et al*., 1995; Qiao *et al*.,1999)。目前发现的杀虫药剂抗性的蚊虫中过量产生的酯酶有 A1, B1, A2-B2, A4-B4, A5-B5, B6, B7, A8-B8, A9-B9 (Weill *et al*., 2001), B10 和 A11-B11 (Cui *et al*., 2007), 酯酶 B1 和 A2-B2 的蚊虫在世界各地广泛分布。

蚊虫在杀虫剂的选择压力下逐渐进化,携带抗性基因的库蚊的迁移在库蚊抗药性进化的过程中具有重要作用(Raymond *et al*., 1991)。由于库蚊的迁移导致种群间基因交流、种群遗传结构发生变化。对自然种群中库蚊抗性动态和遗传多样性的研究,有助于了解种群遗传结构的特征及抗性动态发展状况,从而指导媒介控制。为此,本文通过对所采集的5个不同地理种群的尖音库蚊复组蚊虫进行抗性监测,分析各地理种群的酯酶表型分布及各等位酶遗传多样性,同时结合分子种群遗传学理论,探讨杀虫剂的选择压力和基因流对尖音库蚊复组蚊虫的遗传变异、抗性酯酶分布的影响,为蚊虫综合治理及杀虫剂抗性遗传机制的研究提供基础资料。

1　材料和方法

1.1　野生库蚊的采集

供试蚊虫幼虫均于 2007 年采集,朝阳种群(CY)采自北京市朝阳公园污水沟,新乡种群(XXH)采于河南省新乡市卫河,武汉种群(WHJY)采于湖北省武汉市一地下停车场污水沟,广州种群(HZQ)采于广东省广州市海珠区污水沟,佛山种群(DTY)采自佛山市大塘涌下水道。幼虫带回实验室饲养,室内繁殖后分别对其后代幼虫进行生物测定,本研究用于生测的幼虫为 F_2 代;成虫羽化后, −70℃冷冻保存。

1.2　标准品系

尖音库蚊敏感品系 S-LAB (Georghiou *et al*., 1966), 由法国科学院科学与进化研究所 Raymond 教授提供,本实验室饲养保种。抗性纯合品系 SA2 (Berticat *et al*., 2002)、LING (Weill *et al*., 2001) 和 TEM-R (Mouches *et al*., 1987) 的酯酶表型分别为 A2-B2, A9-B9 和 B1,成虫由法国科学院科学与进化研究所 Raymond 教授惠赠,液氮速冻后,在 −70℃冰箱中保存备用。抗性纯合品系 NEW_2 (Cui *et al*., 2007),酯酶表型为 A11-B11,由本实验室选育而成。

1.3　主要化学试剂

敌敌畏 (dichlorvos) 90% 原油、对硫磷 (parathion) 92% 原油、巴沙 (仲丁威) (fenobucarb) 99% 原油、氯菊酯 (permethrin) 94.8% 原药、胺菊酯 (tetramethrin) 94.3% 原药、溴氰菊酯 (deltamethrin) 98% 原药,均为山东青岛农药厂产品;残杀威 (propoxur) 98% 原粉, Bayer 公司产品。其他试剂均为分析纯产品。

1.4　生物测定方法

参照 Raymond 和 Marquine (1994) 方法进行,在 99 mL 自来水中放人 20 头 4 龄幼虫,加 1 mL 不同浓度的杀虫药剂,总体积共 100 mL,共设置 5 个浓度,每个浓度重复 3 次,24 h 后统计幼虫死亡数。结果使用 PROBIT 软件 (Ratsira *et al*., 1993) 计算 LC_{50} 值和毒力回归方程的斜率。

1.5　水平切片淀粉凝胶电泳

参照 Pasteur (1988) 等的方法,单头蚊虫加 10 μL 蒸馏水,冰浴研磨,研磨后用 Whatman 3 纸芯子蘸取上样,以标准抗性品系作对照,采用 Tris-Malate-EDTA (TME) 缓冲体系进行淀粉凝胶电泳。淀粉胶浓度为 13.6%, 设定电流 110 mA, 电压 90 V, 在 4℃冰箱中电泳,电泳约 6 h 后切片、染色并保存。每种群测定个体数为 60 头。

1.6　种群遗传学数据处理

等位酶位点的命名按常规方法,以酶的缩写字母代表该酶系统,连字符后的数据代表该酶不同的位点,愈靠近正极 (迁移率愈大) 的等位基因以 1 代表,依次以 2 代表。等位基因 (酶带) 的命名的方

法:酯酶等位酶等位基因按酯酶 A、B 系统的分类序号顺序依次命名为 1,2,3,…,等(敏感个体则命名为7),对 Mdh,Me 和 Hk 等同工酶基因座上的不同等位基因命名,则将标准品系在电泳中的迁移距离被设定为 100,其他等位基因根据与标准品系的相对迁移距离而命名,如迁移距离比标准品系大或更大的命名为 110 或 120 等,迁移距离比标准品系小或更小的命名为 90 或 80 等。通过输入各种群中每个个体每个基因位点的基因型,使用 FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001), GENEPOP 4.0 (Rousset, 2008) 等软件进行数据统计分析。

物种和种群的遗传变异常以平均等位基因数(A)、多态位点百分率(P)、平均预期杂合度(H_e)等来度量(Nei, 1973, 1975, 1978)。种群间的遗传分化采用 Nei 氏遗传多样性(Nei, 1977, 1978)以及 Weir 和 Cockerham (1984) 的 *Fit*(总种群内的两个配子之间的相关系数)、*Fst*(种群间的任意抽出的两配子之间的相关系数) 和 *Fis*(种群内两配子之间的相关系数,又称近交系数)计算。Nei 认为所有种群的总遗传多样性(*Ht*)与种群内遗传多样性(*Hs*)和种群间遗传多样性(*Dst*)的关系是:$Ht = Hs + Dst$,存在于种群间的遗传多样性比率 $Gst = Dst/Ht$,Nei 称 *Gst* 为"遗传分化系数",用于衡量种群间遗传分化的程度。

遗传相似性采用 Nei 遗传一致度 (genetic identity)(I)来衡量。运行 GENEPOP 4.0 检测 5 个地理种群是否符合 Hardy-Weinberg 平衡,并用 *Fis* 表示种群平均基因频率偏离 Hardy-Weinberg 遗传平衡的程度。基因流依据公式 $Nm = (1/Fst - 1)/4$ (Wright, 1978)进行计算。

用非加权算术平均法(UPGMA)根据 Nei 的无偏差遗传距离(D)和遗传一致度(I)的关系对 5 个库蚊种群进行聚类分析(Nei, 1978)。

2 结果与分析

2.1 尖音库蚊复组蚊虫抗性水平

5 个地理种群尖音库蚊复组蚊虫对对硫磷、敌敌畏、残杀威、巴沙、氯菊酯、溴氰菊酯和胺菊酯的抗性测定结果见表 1, 5 个库蚊种群对 7 种杀虫剂的死亡率曲线都符合直线回归($P > 0.05$)。由表 1 可知,与 S-LAB 敏感品系相比,朝阳种群对敌敌畏抗性最高(55.7 倍),对氯菊酯抗性为 22.7 倍,仅低于佛山种群;武汉种群对敌敌畏和氯菊酯抗性较高分别为 33.8 倍和 21.4 倍,对对硫磷和溴氰菊酯抗性分别为 11.61 倍和 13.5 倍;佛山种群对氯菊酯抗性最高(123 倍),对溴氰菊酯抗性较高(23.9 倍),对对硫磷和敌敌畏抗性分别为 11.41 倍和 16.94 倍。

5 个种群对有机磷杀虫剂抗性明显高于氨基甲酸酯杀虫剂,对敌敌畏抗性则高于对硫磷,对有机磷杀虫剂抗性:朝阳种群最高,其次为武汉种群,新乡种群抗性最低。5 个种群对氨基甲酸酯的抗性较低,抗性比率(RR) < 10 倍。对拟除虫菊酯杀虫剂的氯菊酯和溴氰菊酯抗性明显高于胺菊酯,佛山种群抗性最高,新乡种群是菊酯类杀虫剂敏感种群, RR 为 1.26 ~ 2.22。

表 1 5 个地理种群尖音库蚊复组蚊虫 4 龄幼虫抗性水平比较

Table 1 Comparison of insecticide resistance levels in 4th instar larvae of five populations of *Culex pipiens* complex

杀虫剂 Insecticide	种群 Population	数量 N	半数致死浓度 LC_{50} (95% CI) ($mg \cdot L^{-1}$)	斜率(标准误) Slope (*SE*)	卡方值 χ^2	抗性比率 RR (95% CI)
对硫磷 Parathion	S-LAB	233	0.00062 (0.00054 - 0.00073)	3.427 (0.616)	0.1156	1
	HZQ	230	0.00300 (0.00249 - 0.00348)	3.998 (0.565)	3.3277	4.81 (3.38 - 6.84)
	XXH	225	0.00321 (0.00254 - 0.00426)	2.521 (0.328)	0.0333	5.15 (3.64 - 7.29)
	CY	339	0.00348 (0.00298 - 0.00388)	4.843 (0.779)	0.024	5.58 (3.99 - 7.81)
	DTY	210	0.00711 (0.00609 - 0.00803)	4.218 (0.921)	0.9198	11.41 (8.34 - 15.60)
	WHJY	362	0.00724 (0.00654 - 0.00831)	3.563 (0.555)	1.6864	11.61 (8.81 - 15.31)
敌敌畏 Dichlorvos	S-LAB	338	0.05154 (0.04623 - 0.05707)	5.017 (0.794)	0.4741	1
	XXH	351	0.44361 (0.39832 - 0.48622)	4.856 (0.568)	0.1779	8.61 (6.39 - 11.60)
	HZQ	215	0.71525 (0.65614 - 0.77012)	7.419 (1.133)	4.6687	13.88 (9.99 - 19.27)
	DTY	223	0.87312 (0.77036 - 0.98848)	3.782 (0.669)	2.0634	16.94 (12.67 - 22.65)
	WHJY	355	1.74197 (1.54174 - 1.96520)	3.474 (0.540)	1.8362	33.80 (25.56 - 44.68)
	CY	358	2.87026 (2.48043 - 3.27383)	3.544 (0.620)	3.4539	55.70 (41.42 - 74.88)

续表 1 Table 1 continued

杀虫剂 Insecticide	种群 Population	数量 N	半数致死浓度 LC_{50} (95% CI) (mg · L^{-1})	斜率(标准误) Slope (*SE*)	卡方值 χ^2	抗性比率 RR (95% CI)
残杀威 Propoxur	S-LAB	227	0.05235 (0.04570 – 0.06013)	5.258 (0.844)	0.5757	1
	XXH	357	0.17273 (0.15477 – 0.18830)	6.403 (0.881)	0.3609	3.30 (2.22 – 4.90)
	HZQ	236	0.23385 (0.19893 – 0.30977)	3.566 (0.848)	0.2413	4.47 (2.94 – 6.78)
	DTY	217	0.25458 (0.17306 – 0.29902)	3.970(1.092)	0.6866	4.86 (3.04 – 7.77)
	CY	341	0.29016 (0.20266 – 0.40697)	5.332 (1.208)	6.5334	5.54 (2.63 – 11.67)
	WHJY	363	0.44814 (0.39121 – 0.55119)	3.587 (0.522)	6.7093	8.56 (5.80 – 12.63)
巴沙 Fenobucarb	S-LAB	230	0.06527 (0.05998 – 0.07101)	7.702 (1.097)	4.7426	1
	DTY	440	0.20589 (0.16656 – 0.24622)	2.114 (0.221)	6.3832	3.15 (2.29 – 4.36)
	HZQ	229	0.27421 (0.24045 – 0.30292)	5.379 (0.852)	3.6144	4.20 (2.90 – 6.09)
	XXH	360	0.38203 (0.34960 – 0.41516)	5.306 (0.578)	1.2887	5.85 (4.20 – 8.17)
	CY	347	0.42955 (0.39467 – 0.46173)	5.007 (0.641)	0.4533	6.58 (4.79 – 9.04)
	WHJY	373	0.52741 (0.49063 – 0.57130)	4.763 (0.631)	0.4199	8.08 (5.92 – 11.03)
氯菊酯 Permethrin	S-LAB	305	0.00467 (0.00415 – 0.00520)	4.281 (0.506)	1.6057	1
	XXH	323	0.00588 (0.00468 – 0.00681)	3.141 (0.726)	0.4508	1.26 (0.93 – 1.70)
	HZQ	223	0.06907 (0.05379 – 0.09179)	2.770 (0.605)	3.4803	14.80 (10.40 – 21.10)
	WHJY	359	0.09973 (0.03089 – 0.33168)	1.741 (0.551)	9.2358	21.40 (11.50 – 39.80)
	CY	339	0.10585 (0.08024 – 0.14631)	1.486 (0.238)	0.2743	22.70 (17.30 – 29.80)
	DTY	212	0.57397 (0.44329 – 0.83309)	2.781 (0.832)	2.6266	123.00 (85.40 – 177.20)
溴氰菊酯 Deltamethrin	S-LAB	390	0.00032 (0.00027 – 0.00037)	3.311 (0.503)	0.8681	1
	XXH	333	0.00071 (0.00053 – 0.00088)	1.913 (0.351)	0.4022	2.22 (1.66 – 2.98)
	CY	349	0.00243 (0.00175 – 0.00311)	1.773 (0.215)	7.6780	7.66 (5.66 – 10.40)
	WHJY	361	0.00429 (0.00206 – 0.00872)	3.188 (0.797)	9.2401	13.50 (6.08 – 30.00)
	HZQ	225	0.00483 (0.00398 – 0.00561)	3.444 (0.631)	1.0739	15.20 (11.04 – 20.90)
	DTY	243	0.00759 (0.00522 – 0.01477)	1.416 (0.375)	0.0796	23.90 (17.01 – 33.52)
胺菊酯 Tetramethrin	S-LAB	419	0.15889 (0.14280 – 0.17938)	5.293 (0.581)	0.0445	1
	XXH	334	0.30940 (0.27527 – 0.34848)	3.258 (0.423)	3.1332	1.71 (0.72 – 4.07)
	HZQ	223	0.42664 (0.37560 – 0.47558)	4.804 (0.930)	3.1252	2.36 (0.96 – 5.78)
	CY	340	0.69421 (0.59317 – 0.81570)	2.685 (0.611)	1.3102	3.83 (1.41 – 10.39)
	WHJY	361	1.05614 (0.86111 – 1.20050)	3.044 (0.656)	2.4427	5.83 (2.12 – 16.01)
	DTY	235	1.12104 (0.46545 – 1.34715)	4.686 (1.729)	2.0060	7.06 (3.80 – 13.11)

2.2　不同种群中过量产生的非特异性酯酶及其基因表型频率

采用淀粉凝胶电泳方法分析了 5 个不同地理种群中的 394 头蚊虫,将淀粉电泳的结果与标准抗性纯合品系已知酯酶酶带比较,统计出 5 个种群的不同酯酶类型及基因表型频率(表 2)。

本研究淀粉电泳共检测出 6 种酯酶表型,5 个种群的酯酶表型类型和频率从表 2 可以看出,酯酶 B1,A2-B2 在 5 个种群均有分布,B1 在北方分布的频率高于南方,而 A2-B2 在南方分布频率则要高于北方,广东两个种群酯酶多态性高于北方。朝阳种群出现 4 种酶型,主要为 B1 和 A9-B9;新乡种群有 3 种酶型,主要酶型同样是 B1 和 A2-B2;武汉种群有 4 种酶型,主要酶型为 B1,A2-B2 和 A11-B11;广州和佛山种群都检测到 6 种酯酶表型,广州有 4 种主要酯酶表型,分别是 B1,A2-B2,A8-B8 和 A9-B9,佛山种群有 3 种主要酯酶表型,分别是 B1,A2-B2 和 A8-B8。A8-B8 为佛山库蚊种群优势酯酶表型,酯酶 A8-B8,A9-B9 和 B1 形成一定比例的杂合子。A11-B11 在武汉种群中比例为 36.26%,在广州种群的比例则为 1.12%。

表 2 5 个地理种群尖音库蚊复组蚊虫抗性酯酶频率分布
Table 2 The frequency distribution of overproduced esterases in five *Culex pipiens* complex populations

种群 Population	数量 N	酯酶频率 Esterase frequency (%)						
		B1	A2-B2	A8-B8	A9-B9	B10	A11-B11	SS
CY	93	64.52	3.23	1.08	10.75	0	0	26.88
XXH	60	75.00	11.67	3.33	0	0	0	20.00
WHJY	91	58.24	13.19	0	9.89	0	36.26	4.40
HZQ	89	43.82	25.84	14.61	16.85	1.12	1.12	12.36
DTY	61	60.66	16.39	42.62	6.56	1.64	1.64	1.64

淀粉凝胶电泳虽然只能定性地表现酯酶,不能准确地定量酯酶基因的扩增倍数,但染色的深浅大体能反映出抗性酯酶在种群中的扩增水平。由不同地理种群蚊虫的淀粉电泳结果与标准抗性品系蚊虫的酯酶酶带颜色深浅比较发现:朝阳种群酯酶 B1 活性较高,染色比较均一,其他表型酯酶染色较淡、活性较低,敏感个体比例较高(图 1);新乡种群酯酶 B1 活性相对偏低,相当于 TEM-R 蚊虫中 1/2 −2/3 之间,染色不均一,敏感个体比例大(图2);武汉种群中存在过量表达的酯酶主要是 B1 和 A11-B11,活性较高、染色均一(图 3);广东的两个库蚊种群中酯酶表型多态性较强,佛山种群中酯酶 B1 和 A8-B8 的活性较高,染色均一(图 4);广州种群过量表达的酯酶主要为 A2-B2,活性约为 SELEX 蚊虫中的 1/2 作用,其他酯酶表型活性低,敏感个体较多(图未列出)。酯酶淀粉电泳结果也支持不同地理种群抗性生测结果。

2.3 等位酶分析与种群遗传多样性

通过等位酶分析,我们获得了 5 个尖音库蚊复组种群等位基因组成和频率分布(数据未列出)。本研究共检测了 4 个等位酶的 9 个酶位点的 35 个等位基因,每个基因座最少有 2 ~ 3 个等位基因,Est-2 和 Est-3 两个位点分别有 7 个等位基因。按照等位基因频率小于 0.99 为多态位点的标准,9 个位点中,朝阳种群中 Hk-1,Hk-2 和 Hk-3 为单态位点,新乡种群中 Me-2 为单态位点,武汉种群中 Mdh-2,Me-1 和 Me-2 为单态位点,广州种群中 Mdh-1,Mdh-2,Hk-1,Hk-2 和 Hk-3 为单态位点,佛山种群中 Mdh-2,Me-2,Hk-1 和 Hk-3 为单态位点。

遗传多样性分析的结果表明,5 个库蚊种群具有较高的遗传多样性(表 3):每位点平均等位基因数(A)为 2.76,平均多态位点百分率(P)为 64.45%,平均预期杂合度(He)为 0.1943。近交系数(Fis)用以衡量种群偏离 Hardy-Weinberg 平衡程度,显示了 5 个库蚊种群大部分基因位点杂合子不足($P < 0.05$),偏离 Hardy-Weinberg 平衡。多态性最高的是武汉种群($A = 2.67$, $P = 66.67\%$, $He = 0.2175$),多态性最低的是朝阳种群($A = 2.67$, $P = 66.67\%$, $He = 0.1683$)。

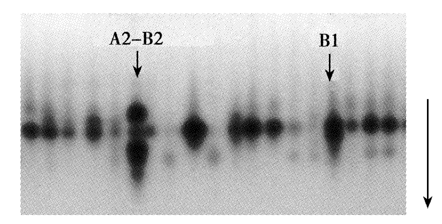


图 1 朝阳种群单头蚊虫酯酶的淀粉凝胶电泳
Fig. 1 Starch gel electrophoresis of esterases from a mosquito of Chaoyang population
箭头示电泳方向。下同。The arrow indicates the electrophoretic migration. The same below.

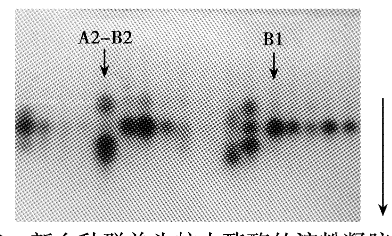


图 2 新乡种群单头蚊虫酯酶的淀粉凝胶电泳
Fig. 2 Starch gel electrophoresis of esterases from a mosquito of Xinxiang population

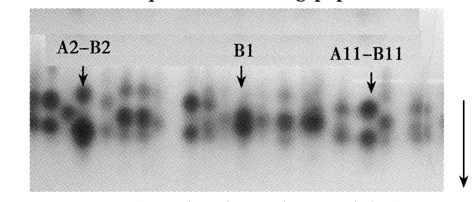


图 3 武汉种群单头蚊虫酯酶的淀粉凝胶电泳
Fig. 3 Starch gel electrophoresis of esterases from a mosquito of Wuhan population

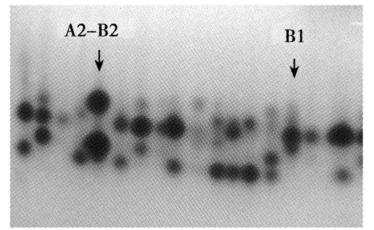


图 4 佛山种群单头蚊虫酯酶的淀粉凝胶电泳
Fig. 4 Starch gel electrophoresis of esterases from a mosquito of Foshan population

表 3 5 个尖音库蚊复组种群的遗传多样性
Table 3 Genetic diversity of the five populations of *Culex pipiens* complex

种群 Population	N	A	P (%)	He
CY	93	2.67 (0.53)	66.67	0.1683 (0.090)
XXH	60	2.89 (0.31)	88.89	0.1938 (0.117)
WHJY	91	2.67 (0.42)	66.67	0.2175 (0.091)
HZQ	59	2.78 (0.58)	44.44	0.2064 (0.057)
DTY	61	2.78 (0.82)	55.56	0.1853 (−0.086)
平均 Mean	72.8	2.76 (0.04)	64.45	0.1943 (0.088)

表中数据为平均值 ± 标准误。Data in the table are mean ± *SE*.

2.4　种群的遗传分化

使用 FSTAT 2.9.3 和 GENEPOP4.0 软件计算出 Nei's 遗传多样性和 F-统计量,分析结果见表 4。

表 4　5 个尖音库蚊复组种群各位点的 Nei's 遗传多样性统计和 F-统计量

Table 4　Nei's statistics of genetic diversity and F-statistics at all loci in five populations of *Culex pipiens* complex

基因座 Locus	平均观察杂合度 Ho	种群内遗传多样性 Hs	总遗传多样性 Ht	种群间遗传多样性 Dst	遗传分化系数 Gst	种群内近交系数 Fis	总近交系数 Fit	种群分化系数 Fst
Mdh-1	0.129	0.150	0.154	0.004	0.023	0.164	0.186	0.027
Mdh-2	0.019	0.043	0.044	0.001	0.023	0.611	0.621	0.026
Me-1	0.075	0.101	0.104	0.003	0.029	0.252	0.284	0.043
Me-2	0.002	0.049	0.050	0.001	0.019	0.945	0.947	0.023
Hk-1	0.065	0.086	0.091	0.005	0.053	0.288	0.336	0.067
Hk-2	0.055	0.073	0.075	0.002	0.027	0.305	0.33	0.036
Hk-3	0.019	0.031	0.032	0.001	0.030	0.404	0.426	0.037
Est-2	0.178	0.617	0.689	0.072	0.104	0.723	0.758	0.125
Est-3	0.181	0.619	0.690	0.071	0.103	0.719	0.754	0.124
平均 Mean	0.080	0.197	0.214	0.018	0.082	0.608	0.647	0.100

表中 9 个基因座的 Gst 平均值为 0.082,Fst 平均值为 0.10,说明种群间存在一定程度的遗传分化,其中 Est-2 和 Est-3 对该分化程度贡献最大。$Hs/Dst = 11$ 说明库蚊种群的总基因多样性相对富集在种群内,私有等位基因平均频率为 0.0273,平均基因流(Nm) = 2.57,种群间存在有一定的基因交流。

2.5　遗传相似性系数和遗传距离

按 Nei 氏的遗传距离(D)与遗传一致性(I)的关系:$D = -\ln I$,计算出 5 个库蚊种群之间的 I 和 D 值,结果见表 5。种群间的遗传一致度从 0.955 ~ 0.995,反映了 5 个种群有很近的遗传关系。种群间最大的遗传距离为 0.046,为朝阳种群与佛山种群之间。朝阳种群与新乡库蚊种群间遗传差异性最小,遗传距离仅为 0.005。广东佛山种群与广州种群的相似性较高,遗传距离为 0.02,但高于朝阳与新乡种群,可能与采样地点环境和佛山当地杀虫剂使用而形成的抗性胁迫有关。根据遗传距离作聚类分析(UPGMA)图(图 5),可以清楚看到各种群间的遗传分化情况。

表 5　5 个尖音库蚊复组种群的遗传一致性(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)矩阵

Table 5　Matrix of Nei unbiased genetic identity (above diagonal) and geneticdistance (below diagonal) coefficients among five populations of *Culex pipiens* complex

种群 Population	CY	XXH	WHJY	HZQ	DTY
CY	–	0.995	0.970	0.965	0.955
XXH	0.005	–	0.980	0.967	0.960
WHJY	0.030	0.020	–	0.970	0.965
HZQ	0.036	0.034	0.031	–	0.980
DTY	0.046	0.041	0.036	0.020	–

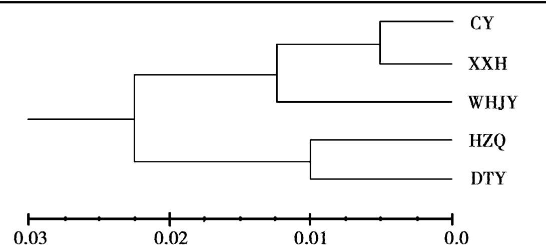


图 5　5 个尖音库蚊复组种群的平均遗传距离聚类图

Fig. 5　Dendrogram generated by cluster analysis of genetic distance among five populations of *Culex pipiens* complex

3　讨论

3.1　不同地区尖音库蚊复组种群的酯酶分布和抗性动态

尖音库蚊复组蚊虫的抗性机理主要有两种:酯酶的活性增加和靶标分子乙酰胆碱酯酶(AChE)的不敏感性。酯酶的过量产生会引起蚊虫对有机磷杀虫剂的抗性,而不敏感的 AChE 可同时蚊虫对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性(Raymond *et al.*, 1987; Ffrench-Constant and Bonning, 1989)。生物测定结果显示,5 个不同的地理种群库蚊对残杀威和巴沙抗性比率在 3.15 ~ 8.56 倍之间,说明这些种群中不敏感的 AChE 基因存在的频率极低,这可能与这些地区氨基甲酸乙酯杀虫剂使用量和频度有关。通讯作者所属研究组从 20 世纪 90 年代起至今

开展对全国尖音库蚊复组蚊虫的抗性追踪调查研究发现(数据未显示)库蚊对有机磷杀虫剂的抗性:北京、武汉地区蚊虫的抗性呈上升趋势,朝阳种群对敌敌畏的抗性高达 55.7 倍,说明这两座城市使用有机磷农药杀灭害虫在局部地区呈增长趋势,导致蚊虫抗性增加;然而,广州和佛山地区蚊虫的有机磷抗性逐渐下降,敏感个体数逐渐增多,可能与该地区杀虫剂使用种类在近几年有所改变,引起蚊虫抗性发生变化,也可能是由于采样地点的差别引起;新乡种群对有机磷杀虫剂抗性与郑州种群相比较低,可能是与新乡使用杀虫剂的种类或频度有关,也可能与采集地点的污染状况有关。

近年来,大中城市和农村家庭以使用拟除虫菊酯类杀虫剂为治理蚊害的主要杀虫剂,害虫对拟除虫菊酯的抗性逐渐上升。本研究显示,佛山种群抗氯菊酯抗性比率极高,为 123 倍,对溴氰菊酯的抗性高达 23.9 倍,朝阳和武汉种群对氯菊酯抗性分别为 22.7 倍与 21.4 倍,这些与长期使用拟除虫菊酯类杀虫剂灭蚊的有一定关系。

本文研究了沿我国京广铁路线起点、终点和途经的两座城市的 5 个地理种群的蚊虫,这些地区的害虫防治比较频繁,不但抗性测定的结果表明对有机磷、拟除虫菊酯杀虫剂存在高抗,而且淀粉凝胶电泳也表明 5 个库蚊种群的酯酶的活性、过量表达呈相关性。研究发现各地库蚊的酯酶表型分布存在差异,与过去研究结果相比较(孙紫青和乔传令,1995;刘俊娥和乔传令,2001;张柯等,2003a,2003b;Cui *et al*., 2006),5 个地区的库蚊酯酶表型频率呈现出一个动态变化,B1 的分布频率在南方种群和中部种群逐渐上升,在北方种群中逐渐下降,A2-B2 的频率变化与 B1 相反;酯酶多态性正向某几种适应当地环境的酶型方向变化,在法国南部长期的野外研究中发现(Guillemaud *et al*., 1998)多种抗性基因的共存是不稳定的,各等位基因间存在取代等方式而达到平衡,如广东库蚊种群酯酶 B1 的频率上升,A8-B8 和 A9-B9 由过去发现多连锁杂合且高频率,正向纯合和频率下降方向变化。Raymond 等(1991)提出酯酶基因的扩增和迁移学说,认为酯酶的祖先等位基因在某地在库蚊种群中发生扩增,通过迁移传播到下一个地区;携带抗性基因的库蚊的迁移在库蚊抗药性进化过程中具有重要作用,尤其是通过交通工具的运输实现的被动迁移;本研究的结果与此相符合。我们于 2003 年在武汉库蚊中发现了 A11-B11 新的酯酶表型(Cui *et al*., 2007),证实为新的基因突变,其在种群中分布的频率为 17% ~24%,本次研究表明在杀虫剂选择压下,A11-B11 的频率上升达到 36.26%,是种群中仅次于 B1 的频率较大的酶型,说明诱导库蚊突变的因素仍然存在,目前正继续作用着库蚊的选择,携带 A11-B11 的库蚊个体比非突变体更能适应现在的生境,导致 A11-B11 基因在居群中扩散。

3.2 蚊虫的抗性与遗传结构的关系

尖音库蚊复组蚊虫对杀虫剂抗性的进化与经典的进化因子如突变、迁移、遗传漂变和选择压力有关。基于对两个地区的蚊虫防治和抗性发展的详细记录的分析及其他分子生物学研究结果,法国学者 Raymond 等(1991)认为:有效突变是罕见的事件,是抗性进化的限速步骤;在库蚊的抗性进化过程中,迁移起着重要的作用。这个学说已经通过对北京种群中广泛存在的 B1 进行研究得到证实(Qiao and Raymond,1995)。在各类进化事件的作用下,种群的遗传结构会发生一系列的变动。所以通过研究种群的遗传多样性格局、遗传变异的时空变化及种群间的遗传差异的大小,可以揭示存在于种群间的基因流动情况,从种群遗传学的角度去解释某一特定种群抗性的发展状况,以弥补分子遗传学研究的不足之处。

5 个不同地理种群的遗传结构分析表明,遗传多样性主要存在于种群之内($Hs=0.197$),但种群之间的遗传分化程度还是较大,$Fst=0.1$,种群所有位点总的近交系数(Fis)$=0.608$,说明大多数基因位点在某一居群中杂合子不足,偏离 Hardy-Weinberg 平衡。在 9 个基因位点中,Est-2($He=0.617$, $Fst=0.125$)和 Est-3($He=0.619$, $Fst=0.124$)位点对种群内和居群间的遗传多样性贡献非常大,与杀虫剂高的选择压有关,而且不同表型酯酶多以纯合子形式存在,也许这种基因型更有利于蚊虫的抗性选择。佛山种群与其他 4 个种群的遗传差异较大,造成这种遗传变异的影响因素有许多,地理隔离、环境差异和种群间基因流的程度。我们检测到在种群内,私有等位基因平均频率为 0.0273,$Nm=2.57$,种群间的基因交流对种群的遗传结构的影响较多,而铁路运输则是基因交流的基础,这正是种群遗传分化程度较低的原因之一,与我们的检测分析一致。

我们的研究结果表明 5 个不同地理种群尖音库蚊蚊虫的遗传结构的一致性非常高,没有明显的地理隔离差异,对表现出的杀虫剂抗性差异是由于不

同地域治理害虫的程度和方法有所不同以及杀虫剂高选择压作用的结果。由于各个地理种群存在一定比例的敏感性个体,因此,建议各有关部门治理害虫时在选择杀虫剂的类型上应选择当地没有经常使用过的、高效低毒的杀虫剂,且多种杀虫剂配合使用,增强杀虫剂的杀虫效果;在剂量方面应用中等以上的剂量治理害虫。这样有利于高效快速杀死害虫,避免害虫过快地产生抗药性,延长杀虫剂的使用寿命。

致谢 法国科学院科学与进化研究所 Raymond 教授提供了标准参考系蚊虫,武汉市疾病预防控制中心吴太平先生帮助采集蚊虫标本,中国科学院动物研究所华月平博士指导统计软件使用,特此致谢!

参 考 文 献 (References)

Berticat C, Rousset F, Raymond M, Berthomieu A, Weill M, 2002. High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 269: 1 413 – 1 416.

Cui F, Lin LF, Qiao CL, Xu Y, Marquine M, Weill M, Raymond M, 2006. Insecticide resistance in Chinese populations of the *Culex pipiens* complex through esterase overproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 120: 211 – 220.

Cui F, Weill M, Berthomieu A, Raymond M, Qiao CL, 2007. Characterization of novel esterases in insecticide-resistant mosquitoes. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 37(11): 1 131 – 1 137.

Ffrench-Constant RH, Bonning BC, 1989. Rapid microtitre plate test distinguishes insecticide resistant acetylcholinesterase genotypes in the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *An. nigerrimus* and *Culex pipiens*. *Med. Vet. Entomol.*, 3(1): 9 – 16.

Georghiou GP, Metcalf RL, Gidden FE, 1966. Carbamate resistance in mosquitoes: Selection of *Culex pipiens fatigans* Wied (*Culex quinquefasciatus*) for resistance to Baygon. *Bull. WHO*, 35: 691 – 708.

Goudet J, 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html.

Guillemaud T, Lenormand T, Bourguet D, Chevillon C, Pasteur N, Raymond M, 1998. Evolution of resistance in *Culex pipiens*: Allele replacement and changing environment. *Evolution*, 52: 443 – 453.

Liu JE, Qiao CL, 2001. Molecular characterization of insecticide resistance in different populations of *Culex pipiens*. *Acta Entomologica Sinica*, 44(3): 290 – 295. [刘俊娥, 乔传令, 2001. 不同地区尖音库蚊复合组抗药性的分子特征. 昆虫学报, 44(3): 290 – 295]

Mouches C, Pasteur N, Berge JB, Hyrien O, Raymond M, de Saint Vincent BR, de Silvestrim M, Georghiou GP, 1986. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science*, 233: 778 – 780.

Mouches C, Magnin M, Berge JB, de Silvestri M, Beyssat V, Pasteur N, Georghiou GP, 1987. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(8): 2 113 – 2 116.

Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70(12): 3 321 – 3 323.

Nei M, 1975. Molecular Population Genetics and Evolution. Elsevieer, New York.

Nei M, 1978. Estimation of average heterzygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 83: 583 – 590.

Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F, Britton-Davidian J, 1988. Practical Isozyme Genetics. Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK. 83 – 155.

Poirié M, Raymond M, Pasteur N, 1992. Identification of two distinct amplifications of the esterase B locus in *Culex pipiens* L. mosquitoes from Mediterranean countries. *Biochem. Genet.*, 30: 13 – 26.

Qiao CL, Raymond M, 1995. The same esterase B1 haplotype is amplified in insecticide-resistant mosquitoes of the *Culex pipiens* complex from the Americas and China. *Heredity*, 74: 339 – 345.

Qiao CL, Sun ZQ, Liu JE, 1999. New esterase enzymes involved in organophosphate resistance in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Guangzhou, China. *J. Med. Entomol.*, 36(6): 666 – 670.

Ratsira D, Prato G, Raymond M, 1993. PROBIT, CRNS-U MII Licence L93019, Avenix, St. Georges d'Orques, France.

Raymond M, Pasteur N, Georghiou GP, Mellon RB, Wirth MC, Hawley MK, 1987. Detoxification esterases new to California, USA, in organophosphate-resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 24(1): 24 – 27.

Raymond M, Callaghan A, Fort P, Pasteur N, 1991. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*, 350(6 314): 151 – 153.

Raymond M, Marquine M, 1994. Evolution of insecticide resistance in *Culex pipiens* populations: the Corsican paradox. *J. Evol. Biol.*, 7: 315 – 337.

Rousset F, 2008. GENEPOP'007: a complete reimplementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Notes*, 8(1): 103 – 106.

Sun ZQ, Qiao CL, 2000. Characterizations of related esterase genes in *Culex pipiens quinquefasciatus* from different geographical regions. *Acta Entomologica Sinica*, 43(Suppl.): 20 – 25. [孙紫青, 乔传令, 2000. 不同地区致倦库蚊种群相关酯酶基因的特征分析. 昆虫学报, 43(增刊): 20 – 25]

Tang ZH, 1993. Insect Resistance and Its Managements. China Agriculture Press, Beijing. [唐振华, 1993. 昆虫抗药性及其治理. 北京: 中国农业出版社]

Vaughan A, Rodriguez M, Hemingway J, 1995. The independent gene amplification of electrophoretically indistinguishable B esterase from the insecticide-resistant mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem. J.*, 305: 651 – 658.

Weill M, Marquine M, Berthomieu A, Dubois MP, Bernard C, Qiao CL, Raymond M, 2001. Identification and characterization of novel organophosphate detoxifying esterase alleles in the Guangzhou area of

China. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 17(4): 238 -244.

Weir BS, Cockerham CC, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1 358 -1 370.

Wright S, 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. Variation within and among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago.

Xu J, Qu F, Liu W, 1994. Diversity of amplified esterase B genes responsible for organophosphate resistance in *Culex quinquefasciatus* from China. *J. Med. Coll. PLA*, 15(2): 101 -105. [徐建农, 瞿逢伊, 刘维德, 1994. 致倦库蚊有机磷抗性相关扩增酯酶 B 基因的多样性. 第二军医大学学报, 15(2): 101 -105]

Zhang K, Ye ZQ, Qiao CL, 2003a. The dynamics of insecticide-resistant and genetic diversity of populations in *Culex pipiens* pallens sampling from northern China. *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.*, 10(4): 218 -225. [张柯, 叶镇清, 乔传令, 2003a. 不同地理种群淡色库蚊抗性动态与遗传多样性的研究. 寄生虫与医学昆虫学报, 10(4): 218 -225]

Zhang K, Ye ZQ, Qiao CL, Lin LF, Cai SW, 2003b. Resistant level, frequency of non-specific esterases and genetic differentiation in mosquitoes *Culex pipiens* quinquefaciatus in three cities of Guangdong. *Zoological Research*, 24(5): 367 -372. [张柯, 叶镇清, 乔传令, 林立丰, 蔡松武, 2003b. 广东省三市致倦库蚊种群的抗性水平、非特异性酯酶分布频率及遗传分化. 动物学研究. 24(5): 367 -372]

(责任编辑: 赵利辉)